

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

27.08.03

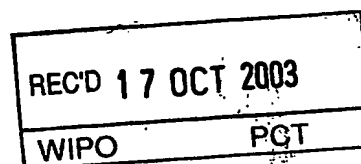
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 8月27日
Date of Application:

出願番号 特願2002-247871
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2002-247871]

出願人 寺田 弘
Applicant(s):

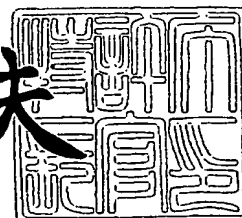


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0003

【提出日】 平成14年 8月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 9/16

【発明の名称】 治療薬

【発明者】

 【住所又は居所】 徳島県徳島市名東町一丁目116番4号

 【氏名】 寺田 弘

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横須賀市二葉一丁目40番14号

 【氏名】 牧野 公子

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都世田谷区東玉川一丁目10番21号

 【氏名】 柚 源一郎

【特許出願人】

 【住所又は居所】 徳島県徳島市名東町一丁目116番4号

 【氏名又は名称】 寺田 弘

【代理人】

 【識別番号】 100110191

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 中村 和男

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 140410

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 マクロファージの貪食活性を誘起し、マクロファージ内の病原体を殺滅することを特徴とする治療薬。

【請求項 2】 マクロファージの貪食活性を誘起し、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導することを特徴とする治療薬。

【請求項 3】 抗酸菌症、エイズ、クラミジア症、又は、トキソプラズマ症のいずれかに対するものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の治療薬。

【請求項 4】 マクロファージの貪食活性を誘起し、機能異常の状態にあるマクロファージに作用することを特徴とする治療薬。

【請求項 5】 クローン病又はリウマチ又はがんに対するものであることを特徴とする請求項 4 記載の治療薬。

【請求項 6】 リファンピシン及び PLGA（ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体）を含み、結核に対するものであることを特徴とする治療薬。

【請求項 7】 さらに PVA（ポリビニルアルコール）を含むことを特徴とする請求項 6 記載の治療薬。

【請求項 8】 各々がリファンピシン、PLGA、及び PVA を含み、主な粒子直径が 1～6 ミクロンである微粒子製剤であることを特徴とする請求項 7 記載の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マクロファージの貪食能を利用し、機能異常マクロファージの正常化を図る、又は種々の感染性病原体に有効な治療薬に関するものである。本発明にかかる治療薬（薬物又は製剤）は、治療上及び／又は診断上の目的で与えられるあらゆる物質及びこれらの集合体を対象とし、その製剤は、薬物（薬物担体を含む）と薬物担体の合剤である。

【0002】

【従来の技術】

I. まず、本発明にかかる治療薬の作用において中核的機能を担うマクロファージについて概説する。

【0003】

マクロファージの形態・機能については、例えば高橋 潔 等著「生命を支えるマクロファージ」、文光堂、2001年に詳述されているが、本発明に関連する背景を述べれば以下の通りである。マクロファージとは単核食細胞系(MPS: Mononuclear Phagocyte System)を構成する細胞である。血中の単球は骨髓細胞中の造血幹細胞に由来し、骨髓中で分裂分化して血中に流出し、種々の組織に定着して種々の名称で呼ばれる単球細胞へと分化する。この細胞は結合組織中では組織球、肝臓ではクッパー細胞、肺では肺泡マクロファージ、リンパ節／脾臓ではマクロファージ、体腔では胸腔／腹腔マクロファージ、骨では破骨細胞、皮膚ではランゲルハンス細胞、神経組織では小膠細胞、脳ではマイクログリア、滑膜ではA型細胞と呼ばれ、組織特異的な性質を有する。

【0004】

1. 一般的性状

- (1). 直径約15～20ミクロンの単核細胞で、細胞質に富み、ガラスやプラスチック表面に粘着し易い。偽足を出して運動し、強い異物貪食作用を持つ。
- (2). 生体防御担当細胞。
- (3). 異物排除機能と免疫能を持つ。
- (4). 抗原情報をTリンパ球に提示して免疫を成立させる。
- (5). インターフェロンによって活性化され、細胞性免疫のエフェクターとなる。
- (6). リンパ球に比較してX線抵抗性である。

【0005】

2. マクロファージの生理的意義

(1). 貪食機能

マクロファージの機能として最もよく知られているものは、貪食作用である。この機能は生命が誕生し、これが進化するにあたって単細胞の時代から備わって

いた最も基本的な機能のひとつと考えてよい。従って、マクロファージの特徴のひとつは、その存在が種横断的に普遍性を持つことである。この特徴は、マクロファージ機能を対象とする研究の大きな利点のひとつを提供していると思われる。つまり、仮に哺乳動物の疾病を対象とした治療薬の開発研究を行う場合であっても、哺乳動物以外のマクロファージが機能的にも研究素材としても有用であり得ることである。この点は、マクロファージが、系統発生的に保存された細胞である点による。

【0006】

(2) . 生体防御機能

マクロファージの機能として次に重要なのは、生体防御作用である。この作用は非特異的生体防御作用と呼ばれるものであるが、近年の研究からマクロファージの生体防御作用にも特異性があることが明らかになりつつある。もともと非特異的という言葉は、T細胞に特徴づけられる抗原特異性や免疫記憶に対応した言葉であり、現在のところ厳密な意味での抗原特異性や免疫記憶がマクロファージに存在することは証明されていないから、その限りにおいて間違いではない。しかし、例えば病原体の種類に応じて、マクロファージの応答は質的に異なること、そして、この質的に異なる応答の一部は、マクロファージ細胞表面の病原体を認識する受容体の違いと対応することが示す様に、異物（又は環境）の刺激に対する細胞応答の側からみれば、マクロファージの特異性は明らかである。

【0007】

現在では、上記の点も踏まえ、マクロファージを中心とする生体防御作用を自然免疫機構 (The innate immune system)、T細胞を中心とする生体防御作用を獲得免疫機構 (The acquired immune system) と捉えるのが一般的になりつつある。さらに、マクロファージの系統発生的普遍性を考えれば、当然であるが、自然免疫機構もまた、系統発生的に高く保存された生体防御機構である。

【0008】

(3) . 自然免疫機構

マクロファージを中心とする自然免疫機構は、獲得免疫機構を持たない生物種にあっても勿論のこと、獲得免疫機構を備えた生物種にあっても、異物識別、排

除機構という生体防御機構の中核を担っている。獲得免疫機構を備えた生物でさえも病原体などの異物の識別・排除は殆どの場合自然免疫機構の機能でまかなわれているが、これが不十分な場合には、獲得免疫機構が動員される。この場合でも、特異的異物識別にはマクロファージ等による抗原提示が必須になるし、外来異物の排除に際して、排除機構の中心を担うのもまたマクロファージ等、自然免疫機構を構成する細胞である。

【0009】

(4) . 異物排除

一方、内因性の異物（例えば、ウイルス感染細胞の除去）などは、獲得免疫に特徴的な細胞傷害性T細胞によって排除されるが、この細胞傷害性T細胞の増殖と成熟との両方に、マクロファージ等による抗原提示を受けた別のT細胞が必須である。すなわち、獲得免疫が、十分な機能を果たすためには、自然免疫機構が完全かつ合目的的に機能することが前提となる。

【0010】

(5) . 機能不全

従って、マクロファージの貪食や抗原提示等の機能不全は、一義的に、免疫不全の潜在的な原因となりうることになる。具体的に言えば、先にI-1項（マクロファージの一般的性状）で述べた諸点に関連する機能不全と疾患として以下に記すものが知られている。すなわち、

(1). 異物貪食作用の異常としての食機能異常症としては白血球接着欠損症、Chediak-Higashi症候群などが知られている。いずれの場合にも、貪食機能に異常が認められており後者では、ライソソーム酵素の貪食空腔への輸送に異常があるために、殺菌能が低下する。このため貪食能は顕著に亢進している。

(2). 生体防御担当機能の異常としての疾患としては、慢性粘膜皮膚カンジダ症があげられる。この疾患に罹患した患者のマクロファージは、遊走能が低下しカンジダの殺菌能も低下している。

(3). 異物排除機能と免疫能の異常としての疾患としては、Wiskott-Aldrich症候群をあげることができる。患者マクロファージは、遊走異常、抗体依存性細胞傷害作用の欠陥など複雑な免疫異常を呈する。

- (4)．抗原情報の提示機能異常としては、T細胞、B細胞は健常にも拘わらず重傷の免疫不全を引き起こす主要組織適合(MHC)クラスII抗原欠損症が知られる。
- (5)．インターフェロンによって活性化され、細胞性免疫のエフェクターとなる点についての機能異常としては、インターフェロン受容体が欠損した幼児は、結核菌感染を防御できず結核菌感染が致死性的となるインターフェロン受容体欠損症が知られる。

【0011】

さらに、獲得免疫細胞を欠損した哺乳動物は存在しかつ生存し得るが、マクロファージ欠損動物は存在し得ない。そして、異物識別・排除を中心とする生体防御機構には、細胞間での情報伝達を行うサイトカインと総称される生理活性物質が重要な機能を果たすことも明らかになりつつある。マクロファージが産生分泌するサイトカインの種類は極めて多様性に富む。この様に、マクロファージの機能は、異物の識別・排除についてみても個体の恒常性維持に必須である。

【0012】

(6)．解剖学的特徴

マクロファージの解剖学的特徴は、種々の組織に定着した固有の性格をもつ組織特異的マクロファージによって異なっている。このことは、個体と環境との接点である粘膜組織でみても明らかである、呼吸器、消化器、泌尿生殖器の粘膜下層には、それぞれ特異的なマクロファージが常在している。これら組織特異的マクロファージは、組織特異的な内外の環境との生体応答を行っている。このことは、マクロファージが異物の識別・排除を超えて生体恒常性の維持に重要な機能を果たしていることを示唆する。組織特異的マクロファージの生理的意義は、未知の点が多い。翻って、新たな視点から、組織特異的マクロファージの存在意義を見ると、まさに種々の病態との関係でこそ、注目されてよい。

【0013】

(7)．病態との関係

何故ならば、マクロファージが免疫機構の中核に位置するとの生理的意義を踏まえれば、組織特異的マクロファージの機能異常は組織特異的な病態の誘導に関わることが強く示唆されるからである。事実、炎症性腸疾病のひとつであるクロ

ーン病において、さらにはリウマチなどの自己免疫疾患、骨粗鬆症などの加齢性疾患など難治性疾患の多くは、マクロファージの機能異常を何らかの形で伴っている。結核菌などの抗酸菌の慢性感染も又、抗酸菌自体の問題とは別に、肺胞マクロファージの機能異常が、病態の背景にあると考えてもよからう。この様に考えれば、標的細胞としてのマクロファージの貪食能を増大させ、その結果マクロファージ内の治療薬の濃度を増大させるような治療薬の開発は、現在、有効な治療法がない結核等感染症を含む難治性疾患の新規治療法を提供する上で、極めて重要かつ合理性のある対象であると言える。

【0014】

II. マクロファージの機能異常と疾患

(1) . 感染性病原体媒体としてのマクロファージ

WHOによると結核、エイズ、マラリアなどは世界的な規模で最も重視しないといけない慢性難治性感染症である。例えば、毎年800万人以上の結核患者が発生し、300万人が死亡しているという。これらの疾病に有効な治療薬（薬物／製剤）を開発することは緊急課題であり、その社会的意義は極めて大きい。

【0015】

ところで、病原体の感染の防御・除去に関し、生体内で最も重要な機能を担う細胞のひとつが、マクロファージである。実際、マクロファージは、生体内臓器、器官のあらゆる場所に分布している。これらマクロファージは存在する臓器、器官によって、形態も機能も異なっているが、病原体の感染の防御・除去を果たすという点では、共通である。

【0016】

一方、感染性病原体は、進化の過程で、マクロファージの攻撃を回避する様々な手段を獲得している。さらに、感染性病原体の中には、マクロファージに潜伏し、マクロファージを宿主するものが多い。この様にしてマクロファージに寄生することに成功した病原体は、慢性的かつ反復的に感染症を引き起こす原因となることは言うまでもなく、致命的な結果を招くことも稀ではない。すなわち、この場合には、本来病原体の感染の防御・除去を達成すべきマクロファージが、一転して感染性病原体媒体として機能することになる。

【0017】

(2) . マクロファージ内の病原体

その典型例を結核に見ることができる。すなわち、病原体（マイコバクテリウム ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、又はマイコバクテリウム ボビス (*Mycobacterium bovis*)）は初期感染経路である肺胞のマクロファージによって貪食されるが、その際形成される食胞（ファゴソーム）内において安定に存在している。つまり、病原体は本来ならばこれらを消化すべきマクロファージを「シェルター」として生存し得る。この他にもライの原因菌であるマイコバクテリウム レプラ (*Mycobacterium leprae*)、非定型抗酸菌症の原因菌であるマイコバクテリウム アビウム (*Mycobacterium avium*) 他や、クラミジア症の原因菌であるクラミジア ニューモニア (*Chlamydia pneumoniae*)、クラミジア トラコマティス (*Chlamydia trachomatis*)、又はクラミジア シッタシ (*Chlamydia psittaci*) など、根治療法が未だに確立されておらず、蔓延が危惧される難治性感染疾患の多くの原因菌もまた、マクロファージが感染病原体媒体となることに共通性が見出される。

【0018】

結核菌、エイズウイルス等は、現在、予防に多大な精力が傾けられている。しかし、いったん感染が成立してしまえば、有効な治療法は存在しない。仮に、感染病原体に対して直接的に殺菌作用をもつ化合物が存在したとしても、一般に、該当する治療薬を単に投与することで、特定の病原体を殺滅するに十分な濃度を病原体保持マクロファージ内で達成することは容易ではない。

【0019】

【発明が解決しようとする課題】

従って、有効な治療薬を投与することで、細胞外の病原体は殺滅できても、病原体媒体としてのマクロファージは依然として病原体供給源として生存し、病原体を供給し続けることになる。現在マクロファージ内に寄生する病原体に対しての根治療法が皆無である理由は、如上の点に求めることができる。本発明はこの点を課題とするものであり、逆に、病原体媒体としての病原体感染マクロファージを殺滅する又は病原体感染マクロファージ内の病原体を殺滅することができ

ば、上述した多くの慢性難治性感染症を根本的に治療することができることになる。このため、マクロファージの機能異常のため、又は、マクロファージを媒体して罹患する疾病に対する治療薬を提供することが本発明の目的である。

【0020】

本発明者らは、鋭意研究を進めた結果、病原体媒体としての病原体感染マクロファージを殺滅すること、病原体感染マクロファージ内の病原体を殺滅すること、又は、疾病のために機能が異常となったマクロファージに作用することを目的とした、全く新しい着想を得るに到り本発明を完成したものである。

【0021】

【課題を解決するための手段】

本発明の治療薬は、マクロファージの貪食活性を誘起し、マクロファージ内の病原体を殺滅することを特徴とする。

【0022】

また、本発明の治療薬は、マクロファージの貪食活性を誘起し、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導することを特徴とする。

【0023】

また、本発明の治療薬は、抗酸菌症、エイズ、クラミジア症、又は、トキソプラズマ症のいずれかに対するものであることが望ましい。これにより、マクロファージが病原体を保持することによる疾患を有効に治療することができる。

【0024】

また、本発明の治療薬は、マクロファージの貪食活性を誘起し、機能異常の状態にあるマクロファージに作用することを特徴とする。

【0025】

また、本発明の治療薬は、クローン病又はリウマチ又はがんに対するものであることが望ましい。これにより、マクロファージが機能異常の状態にあることによる疾患を有効に治療することができる。

【0026】

また、本発明の治療薬は、リファンピシン及びPLGA（ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体）を含み、結核に対するものであることを特徴とする。

【0027】

また、さらにPVA（ポリビニルアルコール）を含むことが望ましい。これにより、界面活性剤を使わずにすむので、PLGA表面の性質を治療薬の表面に与えることができる。

【0028】

また、各々がリファンピシン、PLGA、及びPVAを含み、主な粒子直径が1～6ミクロンである微粒子製剤であることが望ましい。これにより、マクロファージの貪食機能を有効に利用してマクロファージに有効に取り込まれることができる。

【0029】

【発明の実施の形態】

本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

【0030】

マクロファージ全般に備わっており、しかもマクロファージに特異的な機能のひとつに貪食作用があげられている。貪食作用は、大きさが約1ミクロン程度以上の固形物を積極的にマクロファージ細胞内に取り込む機能である。

【0031】

ところで、人工的に作製した固形物を積極的に貪食させるならばマクロファージ内に通常は達成できない濃度で固形物を蓄積させることが可能である。このような固形物は一般に粒子として提供し得るが積極的に貪食させるためには、貪食に有利な粒子径、粒子の表面特性（電荷を有すること、一定の柔軟構造を有することなど）などを最適化する必要がある。例えば、ポリラクテートとポリエチレングリコールを混合した材料を基材としてマクロファージに貪食されやすい粒子を調製することが可能である。

【0032】

そこで、感染病原体又は病原体感染マクロファージに作用する薬物を混和して、粒子を調製するならば、粒子の貪食に伴い薬物もまたマクロファージ内に積極的に取り込まれることになる。

【0033】

本発明の根幹は、マクロファージがもつ貪食機能を積極的に活用して、マクロファージにかかる疾病を治療する点にある。そこで、これらに有効な薬物をマクロファージが貪食しうる微粒子（薬物担体）中に含有させた製剤を調製することで上記目的を達成しようとするものである。

【0034】

通常、薬物担体と薬物との合剤である製剤は、むしろマクロファージによる貪食を回避するための設計が必要である。しかし本発明は、従来とは全く逆転した発想に基づいて、マクロファージの貪食活性を積極的に利用する点に新規性がある。

【0035】

前述の通りマクロファージの生体防御機能の一つに貪食作用が有る。貪食作用はマクロファージに特徴的に認められる固有の機能であり、マクロファージ以外の細胞では取り込むことのできない大きさの粒子を取り込むことができる。細菌などの病原微生物はマクロファージに貪食されマクロファージ内で分解される。従ってマクロファージの貪食機能の生物学的意義の一つは病原微生物の殺滅である。ところでマクロファージは貪食によって活性化され、病原微生物に対抗することが可能となる場合がある。これは貪食によるマクロファージ活性化として知られる現象であり、これによってマクロファージはがん細胞でさえ殺滅することが可能になる。従って、マクロファージを貪食により活性化し、貪食活性を強めることができれば、病原微生物をより強く殺滅することが可能となる。

【0036】

粒子がマクロファージに貪食されるためには、以下の性質を備えている必要があると考えられている。

すなわち、

- ・ 粒子直径は1～6ミクロンである。このような粒子を微粒子と呼ぶ。
- ・ 粒子表面はマクロファージ培養液（生体内ではマクロファージ周辺の体液）で濡れるが、24時間以内には溶解しない。
- ・ 粒子は20～45℃の温度範囲で固体である。

・粒子の比重はマクロファージ培養液（生体内ではマクロファージ周辺の体液）よりも大きい。

・また、粒子は表面に水やイオンが浸透可能な表面層を持つ。

【0037】

一方、粒子を生体内に投与することを考慮すると、粒子表面は生体適合性の高い高分子層を持っている必要がある（バイオマテリアル）し、生体内で生体にとって無毒な成分にまで分解されて代謝される必要がある（生体内分解性）。

【0038】

以上の2つの条件を満たし、容易に粒子に成型可能な高分子として、ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体（以下「PLGA」という）又はポリ乳酸（以下「PL」という）が候補となる。PLはPLGAよりも疎水性が高く、分解までに要する時間が長い。一方PLGAは、モノマー比率に依存して分解速度が変化する。分子量が大きい方が分解までに要する時間は長い。PLGAの分子量が1,000以下の場合には20～45℃の温度範囲で液体として存在する可能性がある。従って、20～45℃の温度範囲で固体として存在するPLGAの分子量は5,000以上が望ましい。

【0039】

さらに、PLGA粒子中に含有している薬物の粒子内からの放出は分子量20,000程度のPLGAの場合にはほぼ0次で薬物が放出される。すなわち、放出量が常に一定に保たれる。しかし、分子量75,000程度のPLGA粒子からはある一定時間（10～20日）後にパルス型に薬物が放出される。本発明が目的とする薬物の放出はパルス型である必要はない。

【0040】

以上の観点から、分子量20,000、乳酸・グリコール酸のモノマー比75：25のPLGAから成る、粒子直径が1～6ミクロンの微粒子製剤がマクロファージに貪食されやすく、しかも、マクロファージ内で薬物を内包する微粒子製剤から薬物が一定の持続性を保ちながら放出されるという目的に対する最適実施例と考えられる。

【0041】

1. 具体的な適用例：結核

その有効性に関する一例として結核について述べる。結核菌は飛沫により気道から肺胞に侵入し、肺胞マクロファージに貪食される。通常であれば貪食された病原体は、細胞内でタンパク分解酵素の攻撃により分解される運命にある。しかし結核菌はタンパク分解酵素の攻撃を回避して、マクロファージ内で生存する。このマクロファージ内の結核菌はマクロファージ外に移行し、持続的に宿主体内に結核菌を供給する。現在抗結核菌薬剤としては、イソニアジド、リファンピシン、硫酸ストレプトマイシン、エタンブタール等の薬物が用いられている。いずれの薬物もマクロファージ外の結核菌に対しては有効であるが、肺胞マクロファージ内の結核菌を殺滅することはできない。このことは肺胞マクロファージ内に結核菌を殺滅するのに十分な薬物濃度が得られないことに主要な原因が求められる。

【0042】

そこで、肺胞マクロファージの貪食作用を利用して肺胞マクロファージ内に結核菌を殺滅するのに十分な薬物濃度が得られれば、肺胞マクロファージ内結核菌をも殺滅することが出来る。この場合貪食作用はマクロファージ内の薬物濃度を選択的に上昇せしめるために利用されることになる。

【0043】

2. 感染症病原体を保持したマクロファージの特異的殺滅を可能とする新規治療薬の提供

結核菌を始めとした種々の感染性病原体を保持したマクロファージの特異的な貪食活性を積極的に活用して、マクロファージ内の病原体又は病原体を保持したマクロファージそのものを殺滅するためには、下記の治療薬が有効である。

- (1). マクロファージの貪食活性を誘起する治療薬
- (2). マクロファージ内の感染病原体に対し直接の殺滅効果をもつ治療薬
- (3). マクロファージに作用する治療薬

(1). の治療薬は、感染性病原体保持／非保持のマクロファージに特異的な貪食受容体を識別し得る構造を有するか、これらのマクロファージに選択的に貪食され得る性質を有しなければならない。従来、マクロファージの貪食能を活性化す

る物質が存在することが知られていた（公知事項）。しかし、この性質を積極的に利用してマクロファージ内の病原体に作用する治療薬を開発する試みは全く為されていない（新規事項）。(2). (3). のタイプは、病原体に直接作用する種々の薬物が対象になるばかりでなく、病原体保持／非保持マクロファージの生理機能を改変する作用を持つDNA又はRNAなど遺伝子自体も薬物として使用可能である。(1). (2). (3). を組み合わせた感染性病原体除去に有効な治療薬を開発する試みは全く為されておらず、本発明の治療薬は、感染性病原体に対する治療に有効な新しいタイプの治療薬である（新規事項）。

【0044】

実際の感染症治療に際しては、(1). のタイプの治療薬に(2). 又は(3). のタイプの薬物を含有させた製剤が有効である。つまり、(2). (3). のタイプの治療薬がマクロファージ内で有効に作用するために、(1). の治療薬は、マクロファージの貪食機能を利用して(2). (3). のタイプの治療薬をマクロファージ内に運搬する機能を担う。すなわち、本発明の対象となる治療薬は図1に示すように、マクロファージに貪食されやすく、単に治療薬のみを投与した場合よりもマクロファージ内の治療薬の濃度が高くなる。すなわち、右側の従来の薬液内にあるマクロファージに取り込まれる薬剤と比較して、左側の本発明による薬剤封入微小球体は積極的にマクロファージに取り込まれてマクロファージ内の薬剤濃度が高くなる。このように、請求の範囲に記載した「マクロファージの貪食活性を誘起し、」とは、単に治療薬を投与した場合よりもマクロファージ内の治療薬の濃度が高くなることを意味する。

【0045】

A. マクロファージの貪食能を増強させる治療薬

PLGAを例として、マクロファージの貪食能を増強させる治療薬の製法及びその効果を説明する。

【0046】

I. PLGA微粒子製剤によるマクロファージ貪食能の増強（本項ではPLGA微粒子そのものが薬効成分である。）

【0047】

1. PLGA微粒子製剤調製法

(a) 材料

(1). PLGA (ポリ (乳酸/グリコール酸) 共重合体) モノマー比: 75:25、分子量20,000、和光純薬株式会社: PLGA-7520

(2). PVA (ポリビニルアルコール) 重合度500

(b). PLGA微粒子製剤の調製

(1). PLGA 500mgを塩化メチレン1.5 mlに溶解する。

(2). PVA (ポリビニルアルコール) を0.3% (w/v)になるように水に溶解する。

(3). (2)のPVA水溶液8 mlを(1)の溶液に加えて3分間攪拌すると水中油滴型(o/w型)エマルションが形成する。

(4). (2)のPVA水溶液200 mlの中に、(3)を加え、520 回転/分で3時間、室温で攪拌する。

(5). 遠心分離 (3,000 回転/分、15分間) によって、微粒子製剤を沈降させて分離し、さらに蒸留水10 mlを加えて2回、遠心分離によって洗浄する。

(6). 1昼夜デシケータ内で減圧乾燥。

(7). 得られた微粒子製剤の粒子径分布を図2に示す。この図から明らかなように調製した微粒子製剤は直径約2ミクロンにピークを持ち、1~10ミクロンの間に分布を持つ。この粒子は常温で固体である。調製に用いたPLGA (500mg)と回収した製剤の全重量から計算した収率は約90%であった。

【0048】

2. PLGA微粒子製剤を貪食することによる肺胞マクロファージの貪食増強効果

(1) 肺胞マクロファージ細胞(NR8383細胞)を 1×10^6 個/mlに培地(Ham F-12K, 15%ウシ胎児血清)で調製し、24穴plateに加え、ここに、PLGA微粒子製剤を0.04、0.4、4マイクログラム(μ g)添加し、炭酸ガス培養器 (37℃)で培養する。

(2) 1時間培養後、培養液を除去し、0.25% トリプシン/リン酸緩衝液を含む生理食塩水(以下PBS) 0.1 mlを添加し室温で5分間放置後、培養上清を除き、洗浄を行う。

- (3) これに、0.1 mlの培地を加え80% パーコール(ファルマシア社) 0.1 mlと混ぜ合わせて40% パーコール溶液を調製し、これを1.5 mlのサンプルチューブに入れた70%パーコール 0.1 mlに重層し、遠心分離(8,000 回転/分、10分間)する。
- (4) 遠心分離後、界面に存在する細胞を回収し、細胞をPBSで洗浄後、培地を1 ml添加し、粒子径2.0ミクロンのフルオレセインイソチオシアネート (FITC)でラベルしたポリスチレンラテックス粒子 (FITC-PSLP)を 1×10^7 個添加し、1時間培養する。蛍光性のFITCでラベルするのは定量を容易に行うためである。
- (5) 培養後、遠心分離(700 回転/分、5分間)し、沈降層のマクロファージにPBSを1 ml加え、遠心分離操作を、2回繰り返す。
- (6) PBSを除いた後に、細胞に10%ホルマリン/PBSを0.1 ml添加し、5分間固定後、蒸留水を1 ml加え、上清を除き、再度蒸留水を1 ml加え、上清を除く。上清を除いた後、0.1 mlの蒸留水を加え細胞を懸濁させ、その懸濁液0.02 mlを取り、スライドグラスに広げ、乾燥させる。
- (7) 蛍光顕微鏡下で複数視野撮影行い、細胞100個当たりのFITC-PSLPを取り込んだNR8383細胞の数を測定する。
- (8) PLGA微粒子製剤によるマクロファージのFITC-PSLP貪食量の増加は表1に示すとおりである。PLGA微粒子製剤によりマクロファージの貪食能が活性化されたことが明らかである。

【0049】

【表1】

表1 PLGA微粒子製剤のマクロファージ貪食能に対する増強作用

PLGA微粒子製剤量 (μg/ml)	FITC-PSLPの取り込み率(%)
0	11.6
0.004	8.8
0.04	12.3
0.4	20.2

【0050】

II. リポ多糖によるマクロファージ貪食能の増強

1. リポ多糖調製法

(a) 材料

(1) グラム陰性菌パントエア(Pantoea)属パントエア・アグロメラン(s(Pantoea agglomerans))

(b) リポ多糖の調製

(1) 7リットル(L)の肉汁培地(トリプトン 10 g/L、酵母エキス 5 g/L、NaCl 10 g/L、グルコース1 g/L、pH 7.5)にパントエア・アグロメラン(s(Pantoea agglomerans))を加え、35℃で1夜振とう培養し、約70 gの湿菌体を集菌する。

(2) 菌体約70 gを500 mlの蒸留水に懸濁し、500 mlの90%熱フェノールを添加して65~70℃で20分間攪拌し、冷却し、水層を回収した。回収した水層を1夜透析してフェノールを除去し、透析内液を分子量20万カットオフ膜により2気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮する。

(3) 得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、陰イオン交換クロマトグラフィー(ファルマシア社製。Q-セファロース・ファースト・フロー)にかけ、10mMトリス-HCl(pH 7.5)及び10mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200~400 mM NaCl/10 mMトリス-HCl(pH 7.5)でリムラス活性画分を溶出させる。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩及び濃縮し、凍結乾燥し、約70 gの湿菌体から約300 mgの精製リポ多糖を得ることができる。

(4) 得られた微粒子製剤の粒度分布並びに性状はPLGAのみの微粒子製剤(I-1-(b)-(7))と同じものであった。

【0051】

2. リポ多糖による肺胞マクロファージの食食増強効果

(1) 肺胞マクロファージ細胞(NR8383)を 1×10^6 個/mlに培地(Ham F-12K, 15%ウシ胎児血清)で調製し、24穴plateに加え、これに、リポ多糖を $1 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、炭酸ガス培養器(37℃)で培養する。

(2) 1時間培養後、1.5mlのサンプルチューブに細胞を移し、培養液を遠心分離(2,000 回転/分、5分間)で除去し、0.25% トリプシン/PBS 0.1 mlを添加し室温で5分間放置後、遠心分離(2,000 回転/分、5分間)して培養上清を除き、PBSで洗浄を行う。

(3) これに、0.1 mlの培地を加え60% パーコール 0.1 mlと混ぜ合わせ30% パー

コール溶液を調製し、遠心分離(8,000 回転/分、10分間)する。

(4) 遠心分離後、液表面に存在する細胞を回収し、細胞をPBSで2回洗浄後、培地を1 ml添加し、粒子径2.0ミクロンのFITC-PSLPを 1×10^7 個添加し、1時間培養する。

(5) 培養後、上清を除き、0.25% トリプシン/PBS 0.1 mlを添加し室温で5分間放置後、培地を1 ml添加し、遠心分離(700 回転/分、5分間)する。

(6) 沈降層のマクロファージにPBSを1 ml加え遠心分離(700 回転/分、5分間)し、上清を除き、再度PBSを1ml添加後、遠心分離(700 回転/分、5分間)し上清を除く。

(7) 上清を除いた後に、細胞に10% ホルマリン/PBSを0.1 ml添加し、5分間固定後、蒸留水を1 ml加え、上清を除き、再度蒸留水を1 ml加え、上清を除く。

(8) 上清を除いた後、0.1 mlの蒸留水を加え細胞を懸濁させ、その懸濁液0.02 mlを取り、スライドグラスに広げ、乾燥させる。

(9) 蛍光顕微鏡下で複数視野撮影行い、細胞500個当たりのFITC-PSLPを取り込んだNR8383細胞の数を測定する。

(10) リポ多糖によるマクロファージのFITC-PSLP貪食量の増加は表2に示すとおりである。リポ多糖によりマクロファージの貪食能が活性化されたことが明らかである。

【0052】

【表2】

表2 リポ多糖によるマクロファージ貪食能の活性化

リポ多糖添加量 ($\mu\text{g/ml}$)	FITC-PSLPの取り込み率(%)
0	30.8
1.0	51.1

【0053】

B. マクロファージ内の病原体に作用する治療薬

リファンピシン-PLGA微粒子製剤貪食によるリファンピシン (抗結核菌薬剤) のマクロファージ内への効果的移行

【0054】

1. リファンピシンを内包したPLGA微粒子製剤の調製

(a) 材料

(1) PLGA (ポリ(乳酸/グリコール酸)共重合体) モノマー比: 75:25、分子量20,000、和光純薬株式会社: PLGA-7520

(2) リファンピシン

(3) PVA (ポリビニルアルコール) 重合度500

(b) リファンピシン-PLGA微粒子製剤の調製

(1) PLGA 500 mgとリファンピシン (0, 50, 100, 200 mg) を塩化メチレン1.5 mlに溶解する。

(2) PVA (ポリビニルアルコール) を0.3% (w/v)になるように水に溶解する。

(3) (2)のPVA水溶液8 mlを(1)の溶液に加えて3分間攪拌するとo/w型エマルションが形成される。

(4) (2)のPVA水溶液200 mlの中に、(3)を加え、520 回転/分で3時間、室温で攪拌する。

(5) 遠心分離(3,000 回転/分、15分間)によって、微粒子製剤を沈降させて分離し、さらに蒸留水10 mlを加えて2回、遠心分離によって洗浄する。

(6) 1昼夜デシケータ内で減圧乾燥。

(7) 得られた微粒子製剤の粒度分布並びに性状はPLGAのみの微粒子製剤(A-I-1-(a)-(7))と同じものであった。

(8) 500 mgのPLGA中にリファンピシンを0, 50, 100, 200 mg含有させた微粒子製剤4 mgを塩化メチレン 1 mlに溶解後、475 nmの吸光度を分光光度計で測定する。

(9) リファンピシン-PLGA微粒子製剤中の回収リファンピシン量は表3に示すように、効率よく製剤化されていることがわかる。

【0055】

【表 3】

表 3 リファンピシン-PLGA微粒子製剤の内包リファンピシン量

リファンピシン (mg)	PLGA量 (mg)	内包リファンピシン (%)
0	500	-
50	500	82.67
100	500	81.94
200	500	88.51

【 0 0 5 6 】

2. リファンピシン-PLGA微粒子製剤の食食による細胞内リファンピシン濃度の選択的増加

(1) 調製したリファンピシン-PLGA微粒子製剤をPBSに微粒子製剤を再分散させ、遠心分離(400回転/分、5分間)を行って大きな粒子を除き、顕微鏡観察により約1~3ミクロンのサイズに調製した微粒子製剤(重量で約30%)を以後の実験に用いる。

(2) 5×10^5 個/0.9 mlに培地で培養したNR8383細胞を、24穴 plateに入れ、これに各リファンピシン-PLGA微粒子製剤0.12 mg/0.1 mlを添加し、12時間培養する。

(3) 培養後、培養液を除去し、0.25% トリプシン/PBS 0.1 mlを添加し室温で5分間放置後、培養上清を除き、洗浄を行う。

(4) これに、0.1 mlの培地を加え80% パーコール0.1 mlと混ぜ合わせ40% パーコール溶液とし、これを1.5 mlのサンプルチューブに入れた70%パーコール 0.1mlに重層し、遠心分離(8,000 回転/分、10分間)する。

(5) 遠心分離後、界面に存在する細胞を回収し、細胞をPBSで洗浄後、細胞中に取り込まれたリファンピシンを塩化メチレンで抽出する。

(6) リファンピシンの量は475 nmの吸光度から決定する。

(7) 対照として各リファンピシン-PLGA微粒子製剤0.12mg中に含まれる同量のリファンピシンのDMSO溶液を調製し、これを1 mlの培地を加えた24穴plateに加え、それにNR8383細胞を添加する。

(8) 細胞を12時間培養後、細胞(5×10^5 個)を回収し、細胞中のリファンピシンを塩化メチレンで抽出する。

(9) リファンピシンのマクロファージによる取り込み量を図3に示す。リファンピシンの添加量が40 ($\mu\text{g}/5 \times 10^5$ 個/穴/ml)において、従来のリファンピシンを含む培地と比較して、本実施例のリファンピシン-PLGA微粒子製剤の場合は約19倍ものリファンピシンを取り込んでいることが示されている。

【0057】

C. マクロファージの貪食能を増強しマクロファージ内の病原体に作用する薬物(A+B)

リファンピシン-PLGA微粒子製剤貪食によるマクロファージの貪食活性増強効果

【0058】

1. リファンピシン-PLGA微粒子製剤の調製

(a) 材料

(1) PLGA (ポリ(乳酸/グリコール酸)共重合体) モノマー比: 75:25、分子量20,000、和光純薬株式会社: PLGA-7520

(2) リファンピシン

(3) PVA (ポリビニルアルコール) 重合度500

(b) リファンピシン-PLGA微粒子製剤の調製

(1) PLGA 500 mgとリファンピシン100 mgを塩化メチレン1.5 mlに溶解する。

(2) PVA (ポリビニルアルコール) を0.3% (w/v)になるように水に溶解する。

(3) (2)のPVA水溶液8 mlを(1)の溶液に加えて3分間攪拌するとo/w型エマルションが形成される。

(4) (2)のPVA水溶液200 mlの中に、(3)を加え、520 回転/分で3時間、室温で攪拌する。

(5) 遠心分離(3,000 回転/分、15分間)によって、微粒子製剤を沈降させて分離し、さらに蒸留水10 mlを加えて2回、遠心分離によって洗浄する。

(6) 1昼夜デシケータ内で減圧乾燥。

(7) 得られた微粒子製剤の粒度分布並びに性状はP L G Aのみの微粒子製剤(A-I-1-(a)-(7))と同じものであった。

(8) PBSに微粒子製剤を再分散させ、遠心分離(400 回転/分、5分間)にて大きな微粒子製剤を除き、顕微鏡観察で約1-3ミクロンのサイズに調整した微粒子製剤を以後の実験に用いる。

【0059】

2. リファンピシン-P L G A微粒子製剤の貪食によるマクロファージ貪食活性増強

(1) 肺胞マクロファージ細胞(NR8383)を 1×10^6 個/mlに培地(Ham F-12K, 15%ウシ胎児血清)で調製し、24穴plateに加え、ここに、P L G A微粒子製剤を0.012、0.12、 $1.2 \mu\text{g}$ 添加し、炭酸ガス培養器(37℃)で培養する。

(2) 1時間培養後、1.5 mlのサンプルチューブに細胞を移し、培養液を除去し、0.25% トリプシン/PBS 0.1 mlを添加し室温で5分間放置後、培養上清を除き、洗浄を行う。

(3) これに、0.1 mlの培地と90%パーコール0.1 mlを加えパーコール濃度を45%とした後に、遠心分離(8,000 回転/分、10分間)する。

(4) 遠心分離後、液表面の細胞を回収し、この細胞をPBSで2回洗浄後、(1)で用いたのと同じ培地を1 ml添加し、粒子径2.0ミクロンのFITC-PSLPを 1×10^7 個添加し、1時間培養する。

(5) 培養後、上清を除き、0.25% トリプシン/PBS 0.1 mlを添加し室温で5分間放置後、培地を1 ml添加し、遠心分離(700 回転/分、5分間)する。

(6) 沈降層のマクロファージにPBSを1 ml加え遠心分離(700 回転/分、5分間)し、上清を除き、再度PBSを1ml添加後、遠心分離(700 回転/分、5分間)し上清を除く。

(7) 上清を除いた後に、細胞に10%ホルマリン/PBSを0.1 ml添加し、5分間固定後、蒸留水を1 ml加え、遠心分離(700回転/分、5分間)し、上清を除く。これに、0.1 mlの蒸留水を加え細胞を懸濁させ、その懸濁液0.02 mlを取り、スライドグラスに広げ、乾燥させる。

(8) 蛍光顕微鏡下で複数視野撮影を行い、細胞500個当たりのFITC-PSLPを取り込んだマクロファージ (NR8383細胞) の数を測定する。

(9) リファンピシン-PLGA微粒子製剤貪食によるマクロファージのFITC-PSLP貪食量の増加は表4に示すとおりである。リファンピシン-PLGA微粒子製剤によりマクロファージの貪食能が活性化されたことが明らかである。

【0060】

【表4】

表4 リファンピシン-PLGA微粒子製剤を貪食したNR8383細胞のFITC-PSLP貪食増強作用

リファンピシン-PLGA微粒子製剤量(μg/ml)	FITC-PSLPの取り込み率(%)
0	30.8
0.012	44.6
0.12	47.2
1.2	51.6

【0061】

以上の結果から、(1). PLGA微粒子製剤及びLPSはマクロファージの貪食能を活性化することが明らかになった。また、(2). リファンピシンのマクロファージ内への移行はPLGA微粒子製剤中に包含されることによって格段に増大すること、及び(3). PLGA微粒子製剤内にリファンピシンが含有されていても、マクロファージ貪食能は活性化されることが明らかになった。従って、リファンピシン含有PLGA微粒子製剤は、マクロファージの貪食能を活性化し、その結果リファンピシンのマクロファージ内濃度は増大し、マクロファージ内に保持されている病原体に対して効率的に作用させるという本発明の目的を達成することが可能となる。上記の結果は、本発明の基本概念である“マクロファージの貪食能の活性化”を利用することにより、マクロファージ内の病原体に作用する治療薬をマクロファージ内に有効に取り込ませる新規治療薬の一例を示すものである。

【0062】

マクロファージが病原体を保持することによる疾患には、抗酸菌症、エイズ、クラミジア症、又は、トキソプラズマ症などがあり、抗酸菌症には、マイコバクテリウム ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、若しくはマイコバクテリウム ボビス (*Mycobacterium bovis*) を原因菌とする結核、マイコバクテリウム レプラ (*Mycobacterium leprae*) を原因菌とするライ、又はマイコバクテリウム アビウム (*Mycobacterium avium*) 他を原因菌とする非定型抗酸菌症などがあり、クラミジア症の原因菌としてはクラミジア ニューモニア (*Chlamydia pneumoniae*)、クラミジア トラコマティス (*Chlamydia trachomatis*)、又はクラミジア シッタシ (*Chlamydia psittaci*) などがあり、いずれも本発明を有効に適用できる。

【0063】

また、本発明を有効に適用できる各疾患に対する薬品を以下に挙げる。

- 1) 抗酸菌症：リファンピシン、イソニアジド、エタンブトール、ピラジナミド、アジスロマイシン、カナマイシン、硫酸ストレプトマイシン、エンビオマイシン、エチオナミド、サイクロセリン、レボフロキサシン、ジアフェニルスルフォ
- ン。
- 2) エイズ：アジドチミジン、ジデオキシイノシン。
- 3) クラミジア症：塩酸ミノサイクリン、塩酸ドキシサイクリン、クラリスロマイシン、スパルフロキサシン、ロキシロマイシン、レボフロキサシン。
- 4) トキソプラズマ症：ピリメサミン、スルファモノメトキシ、アセチルスルピラマイシン。
- 5) マラリア症：磷酸クロロキン、硫酸キニーネ、スルファドキシ、メフロキ
- ン。

6) がん：5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、シスプラチン、エトポシド、マイトマイシン、ビンクリスチン、タキソール、カンプトテシン、ビンブラスチン、サイクロフォスファミド、ブレオマイシン。

7) クロウン病：サラゾスルファピリジン、グルココルチコイド。

8) リュウマチ：金チオリンゴ酸ナトリウム、ペニシラミン、ブシラミン、グルココルチコイド。

【0064】

【発明の効果】

本発明により、マクロファージの機能異常のため、又は、マクロファージを媒体して罹患する疾病を効果的に治療することができる治療薬を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明と従来の治療薬のマクロファージ内薬剤濃度を対比して説明する図である。

【図2】

本発明の実施の形態の微粒子製剤の粒子径分布を示す図である。

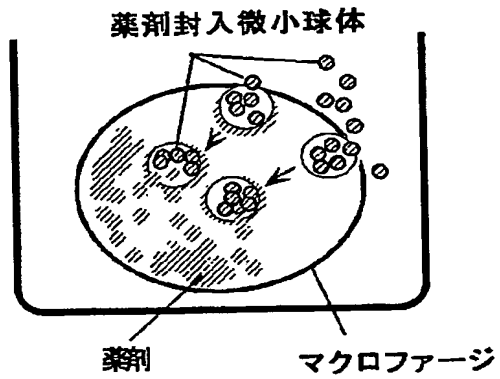
【図3】

リファンピシンの本発明による投与と従来用いられている溶液による投与によってNR8383細胞に取り込まれる量がどの程度異なるかを対比して説明する図である。

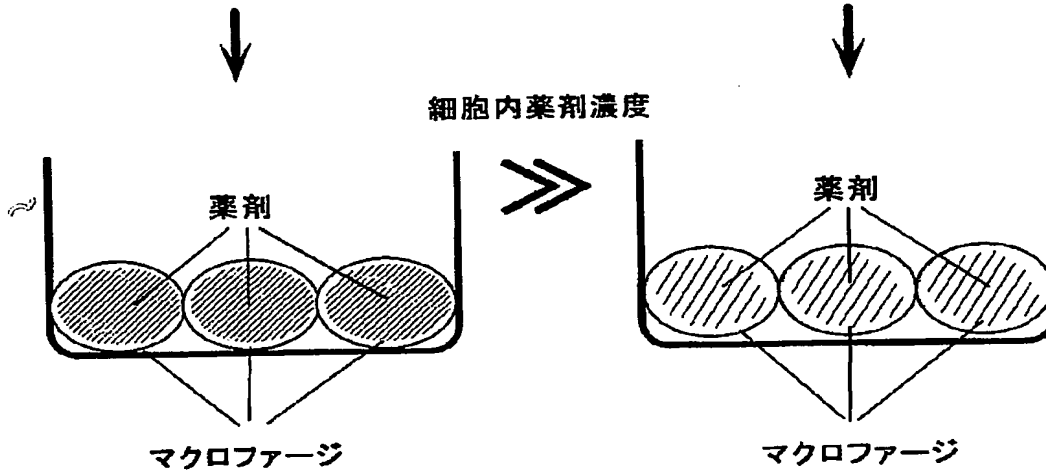
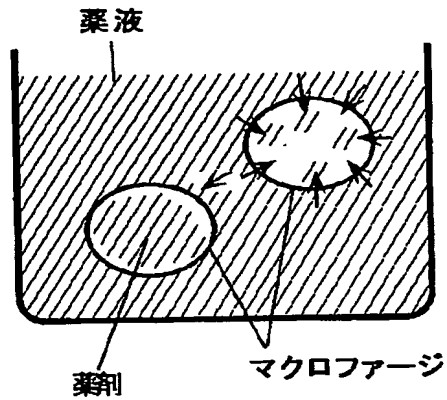
【書類名】 図面

【図 1】

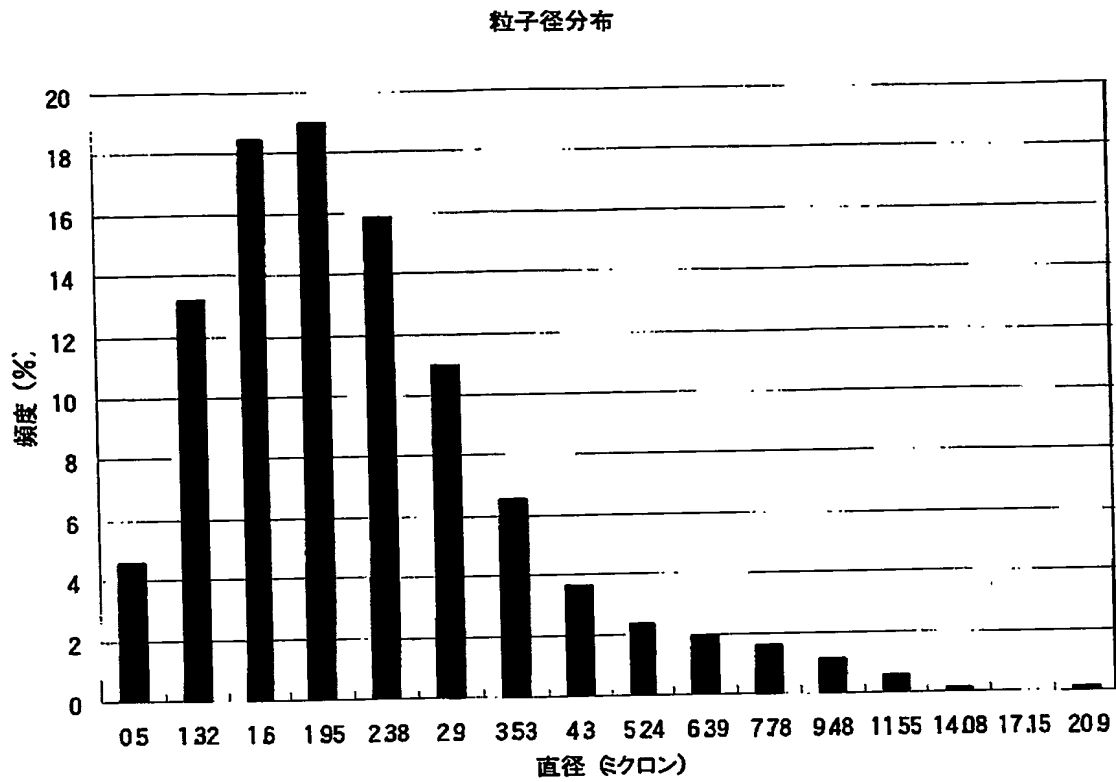
微小球体貪食マクロファージ



薬液浸マクロファージ

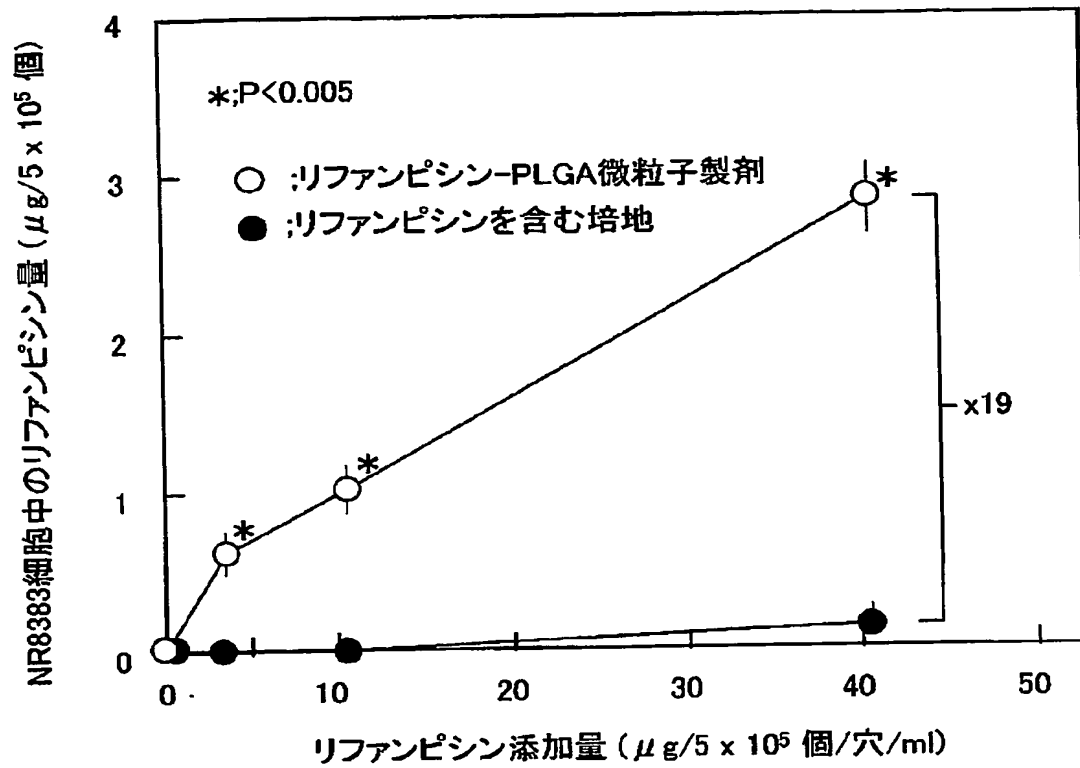


【図 2】



【図3】

NR8383細胞に取り込まれるリファンピシン量



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 機能異常のマクロファージ、又は、マクロファージを媒体して罹患する疾病に対する治療薬を提供すること。

【解決手段】 マクロファージの貪食機能を活性化しこれを利用して、マクロファージに積極的に貪食されることでマクロファージに効率的に取り込ませ、これにより、機能異常となったマクロファージを正常化する、病原体感染マクロファージを殺滅する、又は、病原体感染マクロファージ内の病原体を殺滅する治療薬。

【選択図】 図1